

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590232

研究課題名(和文) スパイン成熟および可塑性を担う新たなリン脂質関連因子の制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on a regulatory mechanism of the maturation of dendritic spines and the synaptic plasticity by lipid-related molecules

研究代表者

謝 敏カク (Xie, Min-Jue)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：40444210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス形成に關する蛋白質の異常により学習障害、痴呆や自閉症の精神症状発現が引き起こされることが近年知られるようになってきた。しかしながら、シナプス形成の分子機構の解明自体はまだまだ十分ではない。我々は、細胞骨格関連因子であるLL5 がLL5 のノックダウン系およびLL5 ノックアウトマウスでスパイン成熟に關わることを見出した。さらに、シナプス後肥厚部(PSD)の構成蛋白であるPSD-95の移動やAMPA型グルタミン酸受容体分子のエンドサイトーシスに關わり長期抑圧(LTD)を制御することを明らかとした。そのことからLL5 がスパイン成熟および可塑性に重要な役割を果たしていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Synapse function and plasticity depend on the morphology of dendritic spine. Here, we report that Phldb2 (pleckstrin homology-like domain, family B, member 2, LL5beta), one binding partner for a well-known actin-cross-linking protein Filamin A, works as a positive regulator of spine maturation. We generated LL5beta knockout mice and found that a proportion of immature spines (filopodia and thin spines) increased in the hippocampus in vivo, which is consistent with our previous observations with LL5beta knocked-down cultured hippocampal neurons. Next, we asked whether or not LL5beta is involved in synaptic plasticity. We observed that NMDA-induced AMPA receptor endocytosis and low-frequency stimulation-induced long-term depression were blocked in hippocampal neurons of the LL5beta knockout mice. Therefore, it is likely that LL5beta plays an important role for the synaptic plasticity and the maturation of dendritic spines.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：シナプス形成 シナプス可塑性 LL5 PSD LTD

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において、シナプスの約90%は興奮性シナプスであり、樹状突起から1ミクロン程度の長さのびるスパインの存在が大きな特徴である。

後シナプスに特徴的なスパインは、一般的に樹状突起フィロポディアがその形態を変化させ、形成されると考えられている。樹状突起フィロポディアはスパイン前駆体として、発達期の脳の神経細胞に多く存在する。樹状突起フィロポディアは細長く、運動性に富み、未熟なシナプスを作り、その後、成熟したスパインの形態をとる。このスパイン形態変化の分子機構を明らかにすることは、脳機能の発達・成熟を分子レベルで解き明かすためには大変重要である。

ごく最近、リン脂質の一種であるフォスファチジルイノシトール(3,4,5)三リン酸(PIP<sub>3</sub>)がスパインの形成に重要であり、後シナプス膜に局在するAMPA型グルタミン酸受容体(AMPA-R)発現維持に働くことが報告された(Arendt KL et al., *Nature Neurosci.* 13: 36; 2010)。我々は、従来から取り組んできた大脳皮質形成に関する研究の過程で、PIP<sub>3</sub>と特異的に結合するPH (pleckstrin homology) domainを持つLL5に着目してきた。そして、LL5が、細胞膜のPIP<sub>3</sub>に応じて、細胞内局在を変化させること、さらに、LL5はフィラミンAに結合し、フィラミンAもこの分子の細胞内局在変化に応じて、その局在を変化させることを最近報告した。(Takabayashi, T et al., *J.Biol.Chem.* 13: 36; 2010)。この結果は、LL5がアクチン線維の動態制御に重要であることを示唆するが、同時にアクチン線維の動態はスパイン形成にとり本質的であるとも報告されている。そこで、我々はLL5がスパイン形成にも重要な役割を担う可能性を検討することとした。

## 2. 研究の目的

シナプス形成に関与する蛋白質の異常により学習障害、痴呆や自閉症の精神症状発現が引き起こされることが近年知られるようになってきた。しかしながら、シナプス形成の分子機構の解明自体はいまだ十分ではない。我々は、最近新たにPIP<sub>3</sub>および細胞骨格関連因子であるLL5が、シナプス形成さらにはシナプス可塑性である長期増強(LTP)や長期抑圧(LTD)などの学習機構に関わることを見出した。そこで、LL5が関与するシナプス後肥厚部(PSD)の分子複合体の形成の仕組みとその機能を解析し、シナプス形成から成熟に至る

分子過程を解き明かし、海馬における学習・記憶などの脳高次機能に關与する新たな分子メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) LL5がスパイン成熟に対して役割を検討した。シナプス成熟過程では、未成熟なフィロポディアやthin型スパインが形成され、その後、成熟に伴い形態がstubby型やmushroom型のスパインとなることが知られている。LL5のノックダウン系およびLL5ノックアウトマウス(KOマウス)を用いて、スパインの形態変化を検討した。

(2) LL5を介し、シナプス後肥厚部(PSD)に存在するPSD-95の移動変化を検討した。LL5がPSD-95に結合することを見出したが、光により活性化するphotoactivatable GFP(PAGFP)とPSD-95の融合タンパクを作成し、PSD-95-PAGFPに光をあて、光活性化したPSD-95の動態を検討した。PAGFPは、紫外光照射により蛍光波長が紫外線領域から可視領域へとシフトする特長を有しており、光活性化された分子の蛍光情報だけを抽出することができる。

(3) LTDにおけるLL5の役割を、スパイン膜上のAMPA-Rの局在変化を検討した。野生型およびLL5 KOマウスの培養海馬神経細胞にHA-AMPA-R発現ベクターを導入し、樹状突起およびスパイン膜表面上におけるAMPA-Rの発現量の変化を検討した。AMPA-R発現量はHAを免染し、定量化した。具体的には、まず、Triton-Xを加えずに膜表面へのHA-AMPA-R発現量を染色し、その後Triton-Xを加え、HA-AMPA-Rの総発現量を染色した。さらに、NMDAにより化学的LTD誘導後、樹状突起およびスパイン膜表面上におけるAMPA-Rの発現量の変化を検討した。

(4) 電気生理学的なLTDの解析を行った。生後3週令野生型およびLL5 KOマウスの培養脳海馬切片のCA1領域に低頻度反復刺激によるLTDの変化を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 海馬は脳の記憶や空間学習能力に関わる脳の器官であるが、LL5が海馬のスパインに強く発現することを認めた。

(2) LL5ノックアウトマウスを作製した。LL5 exon 2をCreリコンビナーゼ標的配列loxP

で挟むターゲティングベクターを構築し、このような遺伝子座を持つ flox マウスを作製した。その後、この flox マウスを tnapCre 発現マウスとかけ合わせることで、LL5 の exon 2 の欠損マウスを得た。LL5 の発現が脳皮質および海馬にて欠損していることを Western blot 法により確認した。その他、腎臓、肺、肝臓などの臓器に対しても LL5 KO マウスでは LL5 の発現の欠損を確認した。

(3) LL5 がスパイン成熟に重要な役割を果たしていることを見出した。シナプス成熟過程ではフィロポディア、thin 型、stubby 型や mushroom 型となることが知られている。Golgi 染色法により、生後 2 週齢マウスの脳切片を用いて、CA1 錐体細胞のスパイン形態変化を検討した。LL5 KO マウスではフィロポディア型や thin 型の未成熟型スパインを多数認めた。この結果は *in vitro* 系にて報告されている LL5 をノックダウンした海馬神経細胞のスパインでは、フィロポディアもしくは thin 型の未成熟型スパインを増加した結果と一致したことから、LL5 は *in vivo* 系にてスパイン成熟に重要な役割を果たすと証明された。

(4) LL5 は PSD に存在する足場蛋白質である PSD-95 の移動を制御していることを見出した。PSD-95-PAGFP 発現 vector を導入した神経細胞にて、Photoactivation 法により PSD-95-PAGFP の移動速度を検討した。光を照射し、PSD-95-PAGFP を発光させたところ、LL5 と共発現したスパインでは PSD-95 の移動が、LL5 が不在場合に比較し速いことを観察した。このことから、LL5 は PSD-95 の移動を制御していることと想定された。

(5) LL5 が AMPA-R の輸送を制御することを見出した。培養海馬神経細胞に HA tag をつけた AMPA-R を発現するベクターを導入し、化学的 LTD 誘導後、樹状突起およびスパイン膜表面上における AMPA-R の発現量の変化を検討した。野生型神経細胞では化学的 LTD 誘導後、樹状突起およびスパイン膜表面に局在する AMPA-R 量が減少し、細胞内に移動したことを観察した。一方、LL5 KO マウスでは LTD 誘導後、樹状突起およびスパイン膜表面に局在する AMPA-R 量の変化が観察されなかった。このことより、AMPA-R のエンドサイトーシス阻害がされたと考えられた。以上のことから、LL5 は AMPA-R の輸送を制御すると想定された。

(6) LL5 は LTD を制御することを見出した。電気生理学的な LTD の解析により LL5 KO マウスでは LTD を起こしにくいことから LL5 がシナプス可塑性に重要な役割を果たしていることを見出した。

以上のことより LL5 はスパインの成熟および可塑性に関わり、なかでもシナプス後肥厚部の分子複合体を制御することで海馬学習の分子メカニズムの重要な一翼を担うと想定された

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda, K., Wang CC., Komada, M., Zhao, H., Sakakibara, A., Miyata, T., Nagata, K., Oka, Y., Iguchi, T. and Sato, M. WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cereb. Cortex* 23(6):1410-1423. (2013) (査読有)

Komada, M., Iguchi, T., Takeda, T., Ishibashi, M. and Sato, M. Smoothed controls cyclinD2 expression and regulates the generation of intermediate progenitors in the developing cortex. *Neurosci. Lett.* 547:87-91. (2013) (査読有)

Komeda, H., Kosaka, H., Saito, N-D., Inohara, K., Munesue, T., Ishitobi, M., Sato, M. and Okazawa, H. Episodic memory retrieval for story characters in high-functioning autism. *Molecular Autism* 4(1):20. (2013) (査読有)

Toba, S., Tamura, Y., Kumamoto, K., Yamada, M., Takao, K., Hattori, S., Miyakawa, T., Kataoka, Y., Azuma, M., Hayasaka, K., Amamoto, M., Tominaga, K., Wynshaw-Boris, A., Wanibuchi, H., Oka, Y., Sato, M., Kato, M. and Hirotsune, S. Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective neuronal migration and neuronal circuit formation in lissencephaly. *Sci. Rep.* 3:1224. (2013) (査読有)

Kuroda, K., Kuang, S., Taketo, MM. and Rudnicki, MA. Canonical Wnt signaling

induces BMP-4 to specify slow myofibrogenesis of embryonic myoblasts. *Skelet Muscle*. 3(1):5. (2013) (査読有)

Kosaka, H., Munesue, T., Ishitobi, M., Asano, M., Omori, M., Sato, M., Tomoda, A. and Wada, Y. Long-term oxytocin administration improves social behaviors in a girl with autistic disorder. (case report) *BMC Psychiatry* 12(1):110. (2012) (査読有)

Takitoh, T., Kumamoto, K., Wang CC., Sato, M., Toba, S., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. Activation of Aurora-A is essential for neuronal migration via modulation of microtubule organization. *J. Neurosci.* 32(32):11050-11066. (2012) (査読有)

Omata, N., Murata, T., Narita, K., Maruoka, N., Mitsuya, H., Mita, K., Nishimoto, T., Sato, M. and Wada, Y. Effects of antidepressants and mood stabilizers on serum levels of adiponectin. *NeuroEndocrinol. Lett.* 33(1):1-2. (2012) (査読有)

Urano, T., Shiraki, M., Yagi, H., Ito, M., Sasaki, N., Sato, M., Ouchi, Y. and Inoue, S. GPR98/Gpr98 Gene Is Involved in the Regulation of Human and Mouse Bone Mineral Density. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97(4):E565-74, (2012) (査読有)

Iguchi, T., Yagi, H., Wang, CC. and Sato, M. A tightly controlled conditional knockdown system using the tol2 transposon-mediated technique. *PLoS ONE* 2012;7(3):e33380. (2012) (査読有)

Komada, M., Asai, Y., Morii, M., Matsuki, M., Sato, M. and Nagao, T. Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. *Toxicology*. 16;295(1-3):31-8. (2012) (査読有)

#### [学会発表](計6件)

Xie, M.-J., Yagi, H., Iguchi, T., Oka, Y., Kuroda, K., Yuzaki, M., Matsuda, S., Shirao, T., Ishikawa, Y. and Sato, M. Phd2 regulates the maturation of dendritic spines and AMPA receptor endocytosis during long-term depression. Society For Neuroscience 2013, 2013, 11, 12. サンディエゴ.  
謝 敏カク. Phldb2 は AMPA 受容体のエン

ドサイトーシスおよび LTD を制御する。  
第 14 回 ORIGIN 神経科学研究会夏のワークショップ、2013, 8, 31. 岐阜県下呂市。  
謝 敏カク, 八木秀司, 猪口徳一, 岡 雄一郎, 黒田一樹, 柚崎通介, 松田信爾, 白尾智明, 石川保幸, 佐藤 真. Phldb2 は樹状突起スパインの成熟および化学的 LTD 誘導後のシナプスでの AMPA 受容体のエンドサイトーシスを制御する。Neuro2013, 2013, 6, 21. 京都。

Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda, K., Wang C.-C., Komada, M., Oka, Y., Iguchi, T. and Sato, M. WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. Neuroscience 2012, 9 21. Nagoya.

Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda K., Wang C-C, Komada M., Iguchi, T. Sato, M. Dendritic growth cone activities are essential for completing multipolar-bipolar transition and starting glia-guided locomotion. Neuroscience 2011, 11, 2. Washington.

謝敏カク, 八木秀司, 黒田一樹, 駒田致和, 猪口徳一, 佐藤真。大脳皮質での glia-guided locomotion の開始には、樹状突起の成長円錐が重要である。第 34 回日本神経科学大会 2011, 9, 15. 横浜。

#### [その他]

本研究の代表者(謝)は福井大学市民公開講座を担当し、講演を通じ情報を発信している(平成 25 年)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

謝敏カク (XIE, Min-Jue)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 40444210

##### (2) 研究分担者

佐藤 真 (SATO, Makoto)  
大阪大学・連合小児発達学研究所・教授  
研究者番号: 10222019

黒田 一樹 (KURODA, Kazuki)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号: 60557966

猪口徳一 (IGUCHI, Tokuichi)  
大阪大学・医学系研究所・助教

研究者番号：60509305

駒田 致和 (KOMADA, Munekazu)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：90523994